

平成21年 3月31日現在

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2006～2008

課題番号：18687007

研究課題名（和文） 脂質ラフトを標的とする毒素の細胞認識とオリゴマーの分子機構

研究課題名（英文） Cell recognition and oligomerization of toxins *via* lipids rafts

研究代表者

北田 栄 (KITADA SAKAE)

九州大学・大学院理学研究院・助教

研究者番号：20284482

研究成果の概要：

殺虫性微生物、バシラス・チュリンジェンシス (Bt 菌) から、がん細胞に対して毒性を示す新しい Bt 菌毒素タンパク質 (パラスポリン 2) を発見した。なぜパラスポリン 2 はがん種細胞特異的に作用するのだろうか？ 今回の研究から、この毒素が細胞表面に存在する局所領域 (脂質ラフト) へ結合して巨大な毒素分子複合体 (オリゴマー) を形成すること、また、毒素と結合するがん細胞因子を発見した。この研究からがん細胞に特異的で人体に安全な抗がん基礎研究の進展が期待できる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	10,100,000 円	3,030,000 円	13,130,000 円
2007 年度	10,800,000 円	3,240,000 円	14,040,000 円
2008 年度	2,300,000 円	690,000 円	2,990,000 円
年度			
年度			
総計	23,200,000 円	6,960,000 円	30,160,000 円

研究分野： 生化学、細胞生物学

科研費の分科・細目：生物学・構造生物学

キーワード：①毒素②微生物③がん④細胞⑤膜

1. 研究開始当初の背景

微生物毒素の多くが細胞膜マイクロドメインである脂質ラフトを標的とすることが知られている。これらの毒素タンパク質の中には、細胞表面の特異的な受容体を認識して、生体膜で自己集合し安定な毒素オリゴマーを形成して細胞膜に様々なサイズの孔を形

成していると考えられている。しかし、その毒素の受容体の認識過程や膜孔形成に必須の毒素複合体化の詳しい分子メカニズムは不明な点が多い。

最近、我々は殺虫性微生物として知られる *Bacillus thuringiensis* (以下 Bt 菌) から新しい細胞毒素 (パラスポリン 2) を発見し、

その遺伝子クローニングに成功した。特にパラスポリン2は、培養がん細胞に対して毒性が高く、細胞への特異性が高い。さらにヒトの各種がん病理組織に対しても有効な細胞破壊活性を示した。生化学、細胞生物学的解析の結果、パラスポリン2は脂質ラフトに結合し、GPI アンカー型タンパク質を介して、次第に毒素オリゴマーを形成することを見いだした。ラフトに結合した毒素モノマーは膜に表在しているが、毒素オリゴマーは膜に挿入されており、その結果、タンパク質が通過できる程度の大きな孔複合体を形成して細胞膜に傷害を与えていることが考えられる。

2. 研究の目的

本研究ではパラスポリン2の細胞認識・作用を決定している分子メカニズムと毒素オリゴマー化に着目し、がん細胞に特異的な毒素受容毒性分子システムの解明を中心に3つの問題点を解決していく。

- (1) 細胞上に存在する受容体分子の同定
- (2) 毒素の受容体結合とオリゴマー化の分子メカニズム
- (3) パラスポリン2と受容体の立体構造解析

3. 研究の方法

(1) パラスポリン2受容体の同定

パラスポリン2の特異的な受容体システムが複数の分子から構成される可能性も十分予想された。よって、生化学的、分子細胞生物学的な複数のアプローチを検討した。

①生化学的アプローチ

ヒト培養細胞の細胞膜からパラスポリン2抗体による免疫沈降法、タグによるプルダウン法、毒素アフィニティークロマトグラフィー法などによってパラスポリン2結合タンパク質の検出と精製を行い、質量分析計でこの分子の同定を行った。

②分子細胞生物学的アプローチ

前述の方法では脂質や糖鎖などタンパク

質以外の受容成分を見逃してしまう問題があった。そこで受性細胞にヒト遺伝子に対する網羅的なノックダウンライブラリーを購入し、遺伝子発現抑制の細胞集団を得た。この細胞群にパラスポリン2を作用させ生存選択法でパラスポリン2耐性細胞を得た。

(2) 毒素の受容体結合とオリゴマー化の分子メカニズム

未変性ゲル電気泳動 (Blue-Native PAGE) と免疫プロット解析をおこない、パラスポリン2の生体膜中での複合体分子構造を解析した。このような温和な条件化で複合体を可溶化し、アフィニティー精製によって複合体分子種の分離を行った。また、この複合体をゲルろ過によって分離分析を行った。

(3) パラスポリン2の立体構造解析

すでに共同研究 (産業総合研究所) によって活性化型パラスポリン2の結晶化に成功した。このX線回折データを高分解能で決定した。また結晶構造解析に必要な位相データの決定のためセレノメチオニンを導入したパラスポリン2を大腸菌で発現し精製した。

4. 研究成果

(1) パラスポリン2受容体の同定

パラスポリン2受容体の解明に向けて、生化学的解析と細胞生物学的解析2つの異なるアプローチを行った。本研究課題においてこれまでに明らかとなったことを以下に示す。

①生化学的手法によるパラスポリン2結合タンパク質の同定

ヒト肝がん培養細胞 (HepG2) の細胞膜にパラスポリン2と結合する因子があるかどうかを明らかにするため、各種架橋剤を用いた解析を行った。この結果、パラスポリン2に対して特異的に架橋反応するHepG2結合分子を発見した (図1)。このパラスポリン2結合分子を免疫沈降法によって分離、精製し、質量分析によって分子種の同定を行った。この結果、結合タンパク質はHep27と呼ばれる

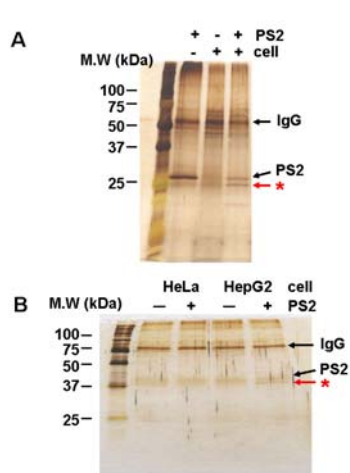


図1 免疫沈降法によるパラスポリン2結合因子の同定
赤い矢印で示すバンドがパラスポリン2に特異的でまた感受性細胞にのみ観察される。このタンパク質を分析した結果、Hep27タンパク質であることが分かった。

タンパク質の一種であることがわかった。

②分子細胞生物学的アプローチ

ヒト遺伝子の約5万種に対して、網羅的な遺伝子発現抑制を行い、その細胞群からパラスポリン2に耐性となった細胞を複数得た。各細胞のパラスポリン2による毒性は大きく2つに分類され、検出範囲では全く死なない細胞、あるいは中程度細胞が死ぬといった表現系が得られている。現段階ではどの遺伝子が抑制されているか精査中であるが、少なくとも2種の因子が関与している可能性が高い。今後の研究進展では、興味深い遺伝子を発見する可能性は大きい。上記①と同様に、その因子の完全な解析は国内外で初の発見であり、また、新しいがん増殖因子、あるいは細胞表面分子の発見が期待できる。

(2) 毒素のオリゴマー化の分子メカニズム

Blue Native 電気泳動は近年、巨大タンパク質複合体の分析法として利用されている。パラスポリン2を作用させた細胞膜を可溶化し、Blue Native 電気泳動と免疫ブロット法で解析したところ、パラスポリン2は約1MDa (1000kDa) と非常に大きなタンパク質複合体として検出された (図2)。オリゴマー化する毒素はこれまで報告があるが、現時点でこのように大きな複合体形成の報告はない。次に生体膜中のパラスポリン2超分子複合体の構成成分を明らかにするため、この複合体

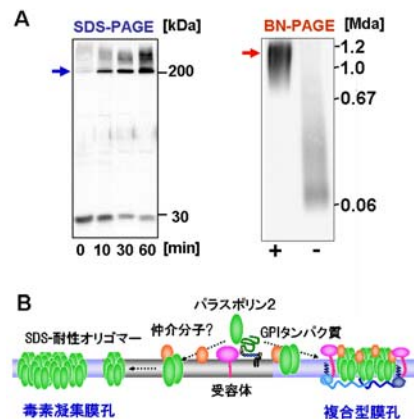


図2 パラスポリン2の細胞膜結合と巨大毒素複合体形成
A、毒素複合体。タンパク質変性を伴うSDS電気泳動法(左)では、パラスポリン2は約200kDaのオリゴマーとして振舞うが、非変性条件でのBN-PAGEでは1MDa以上の非常に大きな毒素複合体を形成(右)していることがわかる。B、二つの予想される巨大な毒素複合体形成モデル。

に核酸や糖鎖、ポリペプチド分解酵素を作用させて Blue Native 電気泳動法で解析した。この結果、核酸分解酵素や糖鎖切断酵素では1MDaの複合体は維持されていたが、プロテイナーゼKによる分解では1MDa~600kDaにヘテロな複合体集団が観察された。このことから、パラスポリン2超分子複合体中にプロテアーゼに感受的な成分が含まれていることが考えられる。今回、脂質ラフトにおける超分子複合体形成がオリゴマー化毒素に一般的な現象であろうこと、また、この毒素複合体には細胞由来の因子が含まれることを発見した。この巨大分子複合体が一部の膜孔毒素の細胞作用メカニズムの根幹に関わっている可能性が予想される。今後は、この複合体に組み込まれている細胞因子の同定と機能を明らかにするとともに、巨大複合体の立体構造解析が必要である。

(3) パラスポリン2の立体構造

パラスポリン2の結晶構造を産業総合技術研究所(秋葉、原田博士ら)との共同研究から2.38-Åの分解能で決定した。単量体のパラスポリン2構造は細長く、そのほとんどがβシート構造からなる(図3)。この立体構造はβ型膜孔形成毒素の一つであるエロリジンに類似している。このことはパラスポリン2がβ構造を基盤とした膜孔形成オリゴマー化型の毒素である可能性を強く支持する。抗がん活性を示す毒素パラスポリンとし



図3 パラスポリン2の結晶構造
今回決定したパラスポリン2の立体構造をリボンモデルで示す。ほとんどがβシート構造から構成されている。

て世界ではじめて高分解能での結晶構造を
発表した。今後パラスポリン2の分子機能解
析や抗がんデザインに利用できる。また、毒
素複合体の構造解析の際にも重要なユニッ
ト構造情報を与えるものである。

(4) おわりに

今回、脂質ラフトを標的とする微生物毒素
パラスポリン2の細胞認識に関わる候補分
子を発見した。また、この毒素が細胞膜で細
胞タンパク質を巻き込んだ巨大な複合体分
子を形成していることがわかった。さらにパ
ラスポリン2の立体構造を共同研究で解明
し、その分子構築基盤を明らかにした(図4)。
今後はパラスポリン2受容体の機能解明や
がん細胞での発現などを明らかにするとと
もに、脂質ラフトをプラットフォームとした
毒素の細胞膜での集積と作用の分子機構を
明らかにする必要がある。

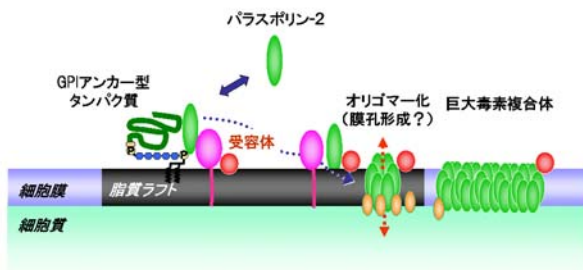


図4 パラスポリン2の生体膜局所領域への結合と毒素オリゴマー化のモデル
パラスポリン2は、標的細胞膜の脂質ラフトに存在するGPIアンカー型タンパク質と今回発見した
Hep27タンパク質の協働的な作用によって細胞特異的に認識し、脂質ラフトの局所領域で受容
体などの分子を介して次第に会合し、最終的には巨大な毒素複合体となって細胞膜障害を引き
起こすと予想される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に
は下線)

[雑誌論文] (計6件) [Impact Factor]

- ① Akiba T., Abe Y., Kitada S., Kusaka Y., Ito A., Ichimatsu T., Katayama H., Akao T., Higuchi K., Mizuki E., Ohba M., Kanai R., Harata K.. Crystal Structure of the Parasporin-2 Bacillus thuringiensis Toxin That Recognizes Cancer Cells. *J. Mol. Biol.* **386**, 121-133 (2009). [4.472]
- ② Tomohiro S., Kawaguti A., Kawabe Y., Kitada S., and Kuge O. Purification and characterization of human phosphatidylserine synthase 1 and 2. *Biochem J.* **418**, 421-429 (2009). [4.009]
- ③ Abe, Y., Shimada, Y., and Kitada, S., Raft-targeting and Oligomerization of Parasporin-2, a *Bacillus thuringiensis* Crystal Protein with Anti-tumor Activity *J. Biochem.* **143**, 269-275 (2008). [2.02]
- ④ Tomonori G. Nishino, T. G., Katsuhiko. K., Kojima, K., Ogishima, T., Ito, A., and Kitada, S. Spatial orientation of mitochondrial processing peptidase and a preprotein revealed by fluorescence resonance energy transfer *J. Biochem.* **141**, 889-895 (2007). [2.02]
- ⑤ Kitada, S., et al (他5名). A Protein from a Parasitic Microorganism, *Rickettsia prowazekii*, Can Cleave the Signal Sequences of Proteins Targeting Mitochondria. *J Bacteriol.* **189**, 844-850 (2007). [4.013]
- ⑥ Kitada, S., et al (他13名). Cytocidal Actions of Parasporin-2, an Anti-tumor Crystal Toxin from *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* **281**, 26350-26360 (2006). [5.581]

[学会発表] (計20件)

- ① 嶋田 拓靖、阿部 雄一、久下 理、北田 栄、
抗腫瘍性毒素 Parasporin-2 は HepG2 細
胞由来のタンパク質を含んだ超分子複

- 合体を生体膜で形成する (BMB2008 日本分子生物学会、日本生化学会、神戸、2008年12月11日)
- ② 大串彰、北田 栄、Marc Juteau、Jean-Louis Schwartz、*Bacillus thuringiensis*由来パラスポリン2毒素小孔の電気生理学的性状調査 (BMB2008 日本分子生物学会、日本生化学会、神戸、2008年12月9日)
- ③ 前田敏孝、阿部雄一、久下 理、北田 栄、網羅的なヒト遺伝子発現抑制系を利用した、抗がん性毒素パラスポリン2耐性HepG2細胞の単離と性質 (BMB2008 日本分子生物学会、日本生化学会、神戸、2008年12月12日)
- ④ 嶋田拓靖、阿部雄一、久下 理、北田 栄、Parasporin-2はHepG2細胞由来のタンパク質を含んだ超分子複合体を生体膜で形成する (第3回パラスポリン研究会、福岡、2008年10月24日)
- ⑤ 阿部雄一、嶋田拓靖、芦田久、前田裕輔、木下タロウ、久下理、北田 栄、微生物毒素パラスポリン2のがん細胞破壊作用におけるGPIアンカー型タンパク質の関与 (第30回日本分子生物学会年会、第80回日本生化学会大会、合同大会横浜、2008年12月14日)
- ⑥ 嶋田 拓靖、阿部 雄一、久下 理、永浜政博、櫻井 純、北田 栄、膜孔形成オリゴマー化毒素は細胞膜で巨大な毒素複合体を形成する (第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会、4P-1184、横浜、2007年12月14日)
- ⑦ Hiroyasu Shimada, Yuichi Abe, Osamu Kuge, and Sakae Kitada Mega assemblage of a mammalian cell-targeting and pore-forming toxin parasporin-2 from *Bacillus thuringiensis*. (40th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, ケベックシティー、カナダ、2007、年8月13日)
- ⑧ Abe Y., Inoue H., Shimada H., Ashida H., Kinoshita T., Kuge O. and Kitada S. Cell-binding and oligomerization of parasporin-2 are mediated by glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. (40th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology. ケベックシティー、カナダ、2007年8月15日)
- ⑨ Sakaé Kitada, Parasporin, an anti-tumor crystal toxin from *Bacillus thuringiensis*. (GEPRON conferences, モントリオール、カナダ、2006年12月12日)
- ⑩ 嶋田拓靖、阿部雄一、久下 理、北田 栄、脂質ラフトを標的とし多量体化する毒素 parasporin-2 は細胞膜中で超分子複合体を形成する (第2回パラスポリン研究会、福岡、2006年10月19日)
- ⑪ 阿部雄一、井上大志、嶋田拓靖、芦田 久、木下タロウ、久下 理、北田 栄、パラスポリン2の細胞認識における GPI アンカータンパク質の関与 (第2回パラスポリン研究会、福岡、2006年10月19日)
- ⑫ Sakae Kitada, Yuichi Abe, Hiroyasu Shimada, Osamu Kuge, Eiichi Mizuki, Michio Ohba and Akio Ito : Cytocidal actions of parasporin-2, a novel crystal toxin targeting human cancer cells from *Bacillus thuringiensis*. (XXXIX Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology、武漢、中国、2006年8月28日)
- ⑬ Yuichi Abe, Hiroshi Inoue, Hiroyasu Shimada, Michio Ohba, Hisashi Ashida, Taroh Kinoshita, Osamu Kuge and Sakae Kitada :GPI-anchored proteins are involved in the cytotoxic actions of parasporin-2, a mammalian cell-targeting crystal protein from *Bacillus thuringiensis* A1547. (XXXIX Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology 武漢、中国、2006年8月28日)
- ⑭ Hiroyasu Shimada, Yuichi Abe, Osamu Kuge and Sakae Kitada: Parasporin-2, an

oligomerizing and pore-forming toxin from *Bacillus thuringiensis*, is assembled into supramolecular complexes in target human cell membranes. (XXXIX Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology 武漢、中国、2006年8月28日)

- ⑮ Hiroyasu Shimada, Yuichi Abe, Osamu Kuge, **Sakae Kitada** Parasporin-2, a lipid raft targeting and oligomerizing cytotoxin from *Bacillus thuringiensis*, is assembled into supramolecular complex on the target plasma membrane. (20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress、2006年6月21日)
- ⑯ Yuichi Abe, Hiroshi Inoue, Hiroyasu Shimada, Hisashi Ashida, Tarih Kinoshita, Osamu Kuge, and **Sakae Kitada** GPI-anchored proteins mediate cell-binding and oligomerization of parasporin-2, a new crystal toxin targeting mammalian cells from *Bacillus thuringiensis*. (20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress、2006年6月21日)

[図書] (計1件)

- ① **北田 栄**、嶋田擴靖、細菌毒素のパラドックス「毒素が薬に食物に? 生命科学への応用について」、生物の科学 遺伝、3月号、エヌ・ティー・エス出版、2009年3月1日

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
○取得状況 (計0件)

[その他]

(1) ホームページ等

- ① 九州大学教育拠点形成プログラム
<http://homepage2.nifty.com/you-know-me/pp/index.html>

② パラスポリン研究会

<http://homepage2.nifty.com/you-know-me/ps/index.html>

③ 九州大学研究者情報

<http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/detail/s/K000757/index.html>

(2) 学会活動

- ① 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会 (BMB2007) : ワークショップ「細胞毒素のパラドックス」: オーガナイザー: **北田 栄**、藤永由香子、横浜、2007年12月14日

(3) 国際活動・貢献

- ① **北田 栄**: 文部科学省平成18年度大学教育の国際化推進プログラム (海外先進研究実践支援) 採択、微生物毒素を用いた抗がん研究への新展開、受入機関名: カナダ モントリオール大学、予定派遣期間: 2006年9月14日~12月17日

(4) 報道関連

- ① 抗がんタンパク質立証、読売新聞 (2月7日) 朝刊14面紙上
② がん攻撃の新規たん白、化学工業報 (2月9日8) 面紙上
③ 正常部位ダメージ少なくガン細胞を狙い撃ち、科学新聞 (2月20日) 6面紙上

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北田 栄 (KITADA SAKAE)

九州大学・大学院理学研究院・助教

研究者番号: 20284482

(2) 研究分担者

なし ()

(3) 連携研究者

なし ()